

На правах рукописи

САВИНОВА ИРИНА ВИКТОРОВНА

**СОДЕРЖАНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ
В ПЕЧЕНИ И МЫШЦАХ И ПРОДУКТОВ ГЛИКОЛИЗА
В КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ
МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» (РНЦ «ВТО») Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Лунёва Светлана Николаевна;
кандидат химических наук, доцент
Плотникова Ольга Михайловна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Русакова Ольга Александровна;
кандидат биологических наук
Ганеева Лилия Ахатовна

Ведущая организация:

ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия»,
г.Челябинск

Защита диссертации состоится «22» марта 2012 в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского (Приволжского) федерального университета

Автореферат разослан «до 21» февраля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор биологических наук,
профессор



(З.И. Абрамова)

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Исследование биохимических основ токсичности и устойчивости живых организмов к действию загрязняющих веществ очень важно для адекватной оценки возможных экологических последствий тех или иных антропогенных воздействий (Калетина, 2008). Среди известных биологических методов оценки загрязнения окружающей среды пока имеется недостаточное количество приемов, позволяющих быстро и количественно оценить величину токсического действия на тест-организмы, особенно при низких концентрациях загрязняющих веществ. Кроме того, методы биотестирования и биомониторинга зачастую не дают ответа, на какие конкретно субстраты и ферментные системы живого организма действуют загрязняющие вещества. Поэтому необходимо вести поиск биоиндикаторов загрязнения, проводить изучение биохимических характеристик живых организмов и разрабатывать оперативные методы экологического контроля и мониторинга состояния природной среды (Ашихмина, 2002).

Эти вопросы особенно актуальны в настоящее время, когда в России реализуется федеральная целевая программа «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации», в рамках которой проводится уничтожение, в частности, таких фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ), как зарин, зоман и VX (Холстов, 2007). Известно, что данные соединения являются производными метилфосфоновой кислоты (МФК). Процесс уничтожения химического оружия включает двустадийную технологию, системы фильтрации (Хайбулин, 2010; Шкодич, 2004) и построен таким образом, чтобы исключить попадание данных веществ в окружающую среду. Однако в случае внештатной ситуации, при попадании в биосферу, данные соединения могут вовлекаться в обмен веществ в живых организмах и влиять на их метаболизм. Изучение возможного влияния имеет значимость как с точки зрения безопасности уничтожения ФОВ, так и с социальной стороны (Ашихмина, 2002; Шкодич, 2004).

Фрагмент МФК входит также в состав некоторых фосфорорганических пестицидов (ФОП), применяемых в качестве инсектицидов (хлорофос), гербицидов (в т.ч. распространенный «Раундап», действующим веществом которого является глифосат), акарицидов, регуляторов роста растений (Мельников, 1987; Шрадер, 1965; Сох, 1998, 2004). Одним из свойств ФОП является быстрое разложение в почве. Несмотря на устойчивость МФК к действию многих факторов окружающей среды (гидролиз, фотолиз,

термическое воздействие) (Савельева, 2002; Bizzigotti, 2009; Munro, 1999), есть сведения о микроорганизмах, способных разлагать фосфонаты (Кононова, 2002, 2007; Кравцов, 2006).

Согласно некоторым исследованиям, МФК имеет низкую токсичность для млекопитающих и водных организмов (Bizzigotti, 2009; Munro, 1999). В литературе имеются данные об исследованиях влияния метилфосфоновой кислоты на дикорастущие растения, ячмень и пелюшку, некоторые тест-организмы (Ашихмина, 2007; Огородникова, 2006, 2007), мхи (Серебрякова, 2007).

Влияние МФК на метаболизм теплокровных животных пока рассмотрено только на примере показателей перекисного окисления белков и эндогенной интоксикации в крови лабораторных мышей (Корепин, 2011). В то же время пока остается неизученным вопрос о возможном воздействии метилфосфонатов на углеводы и их метаболиты, являющиеся наряду с белками и липидами важнейшими химическими соединениями, входящими в состав живых организмов. Как один из главных источников энергии, углеводы необходимы для обеспечения жизнедеятельности организма. Поэтому исследование влияния МФК на такие маркеры энергетических процессов в организме как гликоген, креатин и креатинфосфат, а также продукты гликолиза (лактат и пируват) является актуальным.

Цель исследования: выявить влияние метилфосфоновой кислоты на содержание энергетических субстратов в печени и мышцах и продуктов гликолиза в крови после подкожного введения лабораторным мышам.

Задачи исследования:

1. Определить срок максимального изменения значений биохимических показателей углеводного обмена лабораторных мышей в ответ на подкожное введение МФК в дозе 2 мг/кг массы животного.
2. Исследовать показатели углеводного обмена при подкожном введении различных доз МФК и определить дозы, оказывающие наибольшее влияние.
3. Установить временной промежуток, необходимый для нормализации биохимических показателей лабораторных мышей после однократного подкожного введения МФК в высокой и низкой дозе.
4. Выявить наиболее информативные биохимические показатели углеводного обмена, которые могут являться индикаторами воздействия МФК на живой организм.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. МФК оказывает влияние на биохимические показатели углеводного обмена лабораторных мышей. Максимальное изменение большинства изученных показателей углеводного обмена в ответ на подкожное введение МФК в дозе 2 мг/кг массы животного наблюдается через 72 часа.

2. МФК обладает дозозависимым эффектом. Подкожное введение МФК в дозе 10^{-3} мг/кг через 72 часа вызывает гипоксическое состояние организма, а в дозе 10^{-12} мг/кг МФК – активацию механизма адаптации организма к гипоксии. Через 18 суток после введения данных доз МФК самкам лабораторных мышей наблюдается нормализация биохимических показателей углеводного обмена.

Научная новизна исследования. Впервые исследовано влияние МФК на показатели углеводного обмена лабораторных мышей. Впервые проведено изучение зависимости время – эффект для показателей углеводного обмена в ответ на введение МФК в дозе 2 мг/кг. Выявлено, что максимальные отличия показателей наблюдаются через 72 часа после введения. Впервые изучены изменения показателей углеводного обмена в ответ на введение различных доз МФК. Обнаружено, что введение лабораторным мышам высокой (10^{-3} мг/кг) дозы МФК вызывает гипоксическое состояние организма, а в ответ на введение низкой (10^{-12} мг/кг) дозы МФК наблюдается активация механизмов адаптации организма к гипоксии. Впервые определено, что нормализация показателей углеводного обмена происходит к 18-м суткам после однократного введения МФК. Впервые обнаружены половые различия показателей углеводного обмена в ответ на введение МФК – у самок введение МФК оказывает большее влияние на содержание продуктов гликолиза, а у самцов – на содержание гликогена в тканях.

Научно-практическая значимость исследования, область внедрения.

Проведенное исследование позволило получить новые знания о влиянии МФК на биохимические показатели углеводного обмена лабораторных мышей.

Выявлены наиболее информативные показатели углеводного обмена, которые могут быть использованы в целях экологического мониторинга за состоянием теплокровных животных в зонах расположения опасных химических производств, в т.ч. объектов уничтожения оружия с фосфорорганическими отравляющими веществами.

Результаты проведенного исследования использовались для разработки аттестованных в Межрегиональной лаборатории экотоксикологии Регионального центра по обеспечению государственного экологического контроля и мониторинга объектов по хранению и уничтожению химического оружия (РЦ СГЭКиМ) по Курганской области «Методики выполнения измерений биохимических показателей в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных фотометрическим методом», свидетельство об аттестации ФГУП «УНИИМ» № 224.11.03.052/2009 от 17.06.2009 г. и «Методики измерений активности ферментов в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных фотометрическим методом» свидетельство об аттестации ФГУП «УНИИМ» № 224.0477/01.00258/2011 от 29.11.2011 г.

Результаты работы будут представлять несомненный интерес для лабораторий биомониторинга и биотестирования, экотоксикологии РЦ СГЭКиМ по Курганской области, а также для аналогичных лабораторий РЦ СГЭКиМ Кирова, Ижевска, Саратова, Пензы. Кроме того, разработанные методы будут представлять практический интерес для природоохранных организаций разного уровня, в дальнейшем могут стать основой для их внедрения в систему государственного экотоксикологического контроля и использоваться при определении класса опасности токсичных отходов производства и потребления согласно СП 2.1.7.1386-03.

Материалы работы используются в курсе лекций по химико-аналитическому контролю качества окружающей среды, спецкурсах по биохимии, химии окружающей среды и химической экспертизе для студентов факультета естественных наук Курганского государственного университета.

Апробация работы. Материалы диссертационного исследования доложены: на региональной конференции молодых ученых, посвященной году молодежи в России «Молодежный научный потенциал в инновационном развитии Уральского региона» (Курган, 2009); на VII Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития» (Киров, 2009); на региональной молодежной научно-практической конференции с международным участием «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы» (Улан-Удэ, 2010, 2011); на всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Биология будущего: традиции и инновации» (Екатеринбург, 2010); на международной конференции «Антропогенная трансформация природной среды» (Пермь, 2010), на VIII Всероссийской научно-практической

конференции «Современные проблемы биомониторинга и биоиндикации» (Киров, 2010).

Декларация личного участия автора. Экспериментальные исследования выполнялись автором лично. Обработка полученных данных, их интерпретация и оформление осуществлены автором самостоятельно.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, из которых 1 монография и 5 статей в изданиях, рекомендуемых ВАК для публикации основных результатов кандидатских диссертаций.

Объем и структура работы. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 глав, заключения, практических рекомендаций, выводов, списка литературы, 33 таблиц, 45 рисунков. Библиографический указатель включает 199 источников: из них 131 – отечественные, 68 – зарубежные. Диссертационное исследование выполнено по плану НИР ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова», номер госрегистрации 0120.0802849.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследования были проведены на белых лабораторных мышах линии СВА (540 животных) - самцах и самках в возрасте 2-х месяцев, массой 26 ± 3 г.

Материалом исследования служили: мышечная ткань, печень, сыворотка крови. В ходе выполнения исследования применялись биохимические и статистические методы.

Для изучения влияния МФК на биохимические показатели углеводного обмена лабораторные мыши были разбиты на серии и группы животных. Схема эксперимента показана в таблице 1.

В ходе эксперимента опытным лабораторным мышам вводились нейтрализованные изотонические растворы МФК подкожно в брюшинной области объемом 0,04 мл одноразовым инсулиновым шприцем. Контрольным группам подкожно вводился физиологический раствор объемом, эквивалентным опытной группе. Введение осуществлялось в первой половине дня. Эвтаназия осуществлялась натошак методом декапитации в первой половине дня. Для исследования брали печень для выделения гликогена, скелетные мышцы для выделения гликогена, креатина и креатинфосфата, а также цельную кровь, которую центрифугировали при 4000 об/мин 10 мин для получения сыворотки.

В сыворотке крови определяли содержание продуктов гликолиза – пирувата (ПВК) и лактата (МК) и активность ферментов – лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинкиназы (КК). Определение концентрации ПВК проводили модифицированным методом Умбрайт. Содержание МК определяли по аттестованной в лаборатории экотоксикологии РЦ СГЭКиМ «Методике выполнения измерений биохимических показателей в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных фотометрическим методом». Активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом: ЛДГ с помощью наборов фирмы DiaSys Diagnostic (Германия), КК – с помощью наборов реагентов фирмы Vital Diagnostic (РФ).

Уровень гликогена в мышцах определяли непрямым антроновым методом, в печени – прямым антроновым методом. Содержание креатина в скелетных мышцах находили по реакции с диацетилом, креатинфосфата (КрФ) – по содержанию фосфора в безбелковом тканевом экстракте.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев непараметрической статистики: при исключении выбросов использовали метод Титъена-Мура, проверяя минимум и максимум значений выборки; достоверность различий между двумя выборками определяли по критерию рандомизации (при n от 5 до 12) и W-критерия Вилкоксона для независимых выборок (при n от 12 до 40). Результаты анализов усредняли с помощью медианы, на основании которой считали различия в процентах (%) опытных и контрольных групп. Корреляционную зависимость между выборками, подчиняющимися нормальному распределению, оценивали по критерию Пирсона, не подчиняющимся закону распределения – по критерию Спирмена. Результаты корреляционного анализа представляли в виде коэффициента корреляции с уровнем значимости $p \leq 0,05$ и уравнения регрессии. Факторный анализ проводили методом главных факторов, метод оценки общностей – анализ главных компонент (Гайдышев, 2001; Гланц, 1998). Обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Microsoft Excel. При статистической обработке результатов исследования был использован интегратор модульной программы AtteStat 1.0 для программы Microsoft Excel, разработанный в лаборатории информационно-вычислительного центра ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации И.П. Гайдышевым.

Таблица 1.

Схема экспериментальной части исследования

Серии	Группы	Лабораторные мыши						Кол-во мышей
<u>1 серия</u> Референтные значения	Интактные группы, здоровые животные	20 ♀						40 мышей
		20 ♂						
<u>2 серия</u> Установление времени максимального изменения изучаемых биохимических показателей	Группы	Срок эксперимента						240 мышей
		12 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч	120 ч	
	Опытные группы, введение МФК в дозе 2 мг/кг массы	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	
		10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	
	Контрольные группы, физиологический раствор	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	
		10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	
<u>3 серия</u> Изучение дозозависимого эффекта (через 72 ч после введения МФК)	Группы	Дозы МФК, мг/кг						160 мышей
		10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻⁹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹⁸	
	Опытные группы, введение МФК в различных дозах	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	
		10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	
	Контрольные группы, физиологический раствор	20 ♀						
		20 ♂						
<u>4 серия</u> Изучение нормализации биохимических показателей	Группы	Доза, мг/кг	Срок эксперимента					100 мышей
			3 суток (данные из 3 серии)	6 суток	12 суток	18 суток	30 суток	
	Опытные группы, введение МФК в дозах 10 ⁻³ , 10 ⁻¹² мг/кг массы	10 ⁻³	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	
		10 ⁻¹²	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	
	Контрольные группы, физиологический раствор		20 ♀	10 ♀	10 ♀	-		
		Контроль 18, 30 суток не делался ввиду отсутствия достоверных отличий между предыдущими контрольными группами						

Примечание: ♀, ♂ - самки и самцы лабораторных мышей. Контрольные и опытные группы лабораторных мышей содержались в стандартных, однотипных условиях вивария, получали питание и воду в достаточном количестве. Эвтаназия осуществлялась методом декапитации с соблюдением всех биоэтических правил.

Результаты собственного исследования и их обсуждение

При изучении показателей углеводного обмена у лабораторных мышей через 12-120 часов после подкожного введения МФК в дозе 2 мг/кг было выявлено, что наиболее значительные отклонения относительно контрольных групп наблюдаются для содержания таких показателей, как гликоген мышц, ПВК и КК сыворотки крови (см. рис. 1).

Через 12 часов после введения МФК у самцов отмечался значительный рост активности КК (на 106%), а также уменьшение содержания гликогена в тканях (в печени на 16%, в мышцах на 68%) и ПВК в сыворотке крови на 12%. В отличие от самцов, у самок отмечалось лишь снижение уровня креатина на 9% и КрФ на 30%.

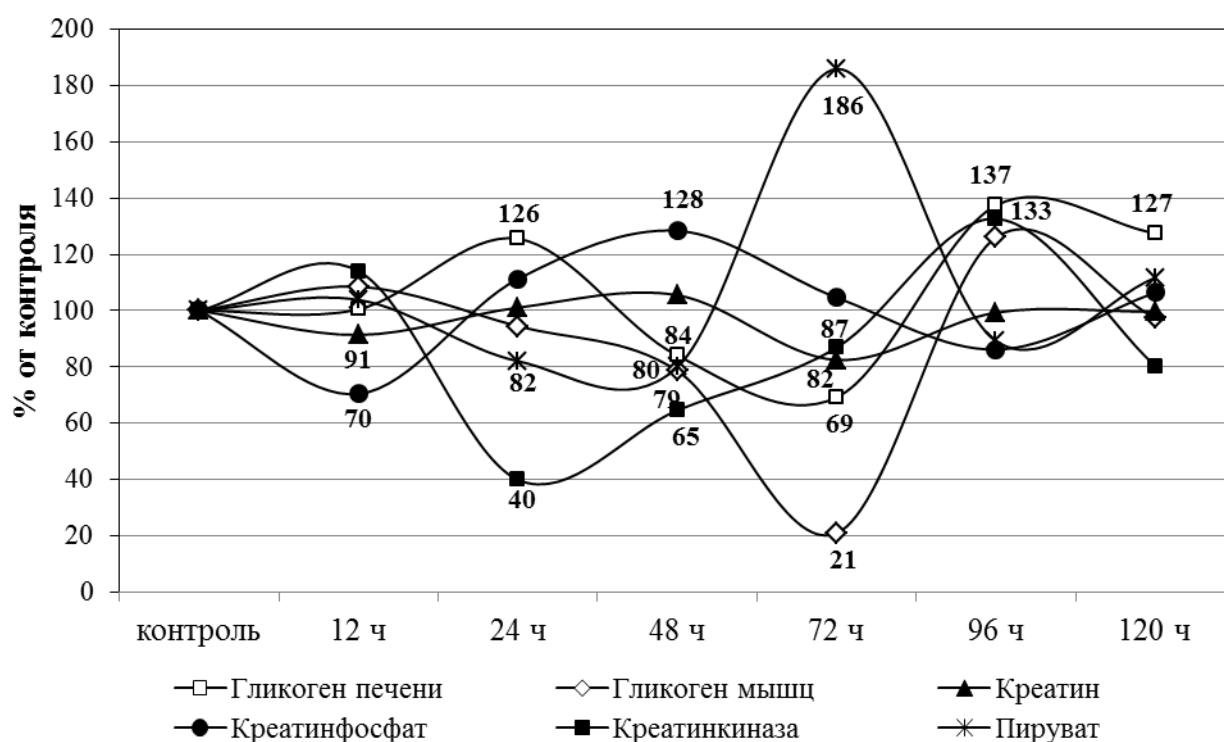
Спустя 24 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг в сыворотке крови лабораторных мышей наблюдалось уменьшение активности КК (у самок на 60%, у самцов на 76%) и повышение содержания гликогена в печени (у самок на 26%, у самцов на 40%). Уровень ПВК в сыворотке крови у самок понижался на 18%, а у самцов, наоборот, повышался на 38%. Также у самцов обнаружено уменьшение содержания КрФ и гликогена в скелетных мышцах (на 37% и 20% соответственно).

В ответ на подкожное введение МФК в дозе 2 мг/кг через 48 часов после введения как для самок, так и для самцов было обнаружено понижение активности КК (на 60% и 76% соответственно). У самок также стоит отметить повышение уровня КрФ в мышцах на 28% и понижение содержания гликогена в тканях (в печени на 16%, в мышцах на 21%). У самцов, в отличие от самок, наблюдалось повышение содержания гликогена в тканях (в печени на 18%, в мышцах на 73%).

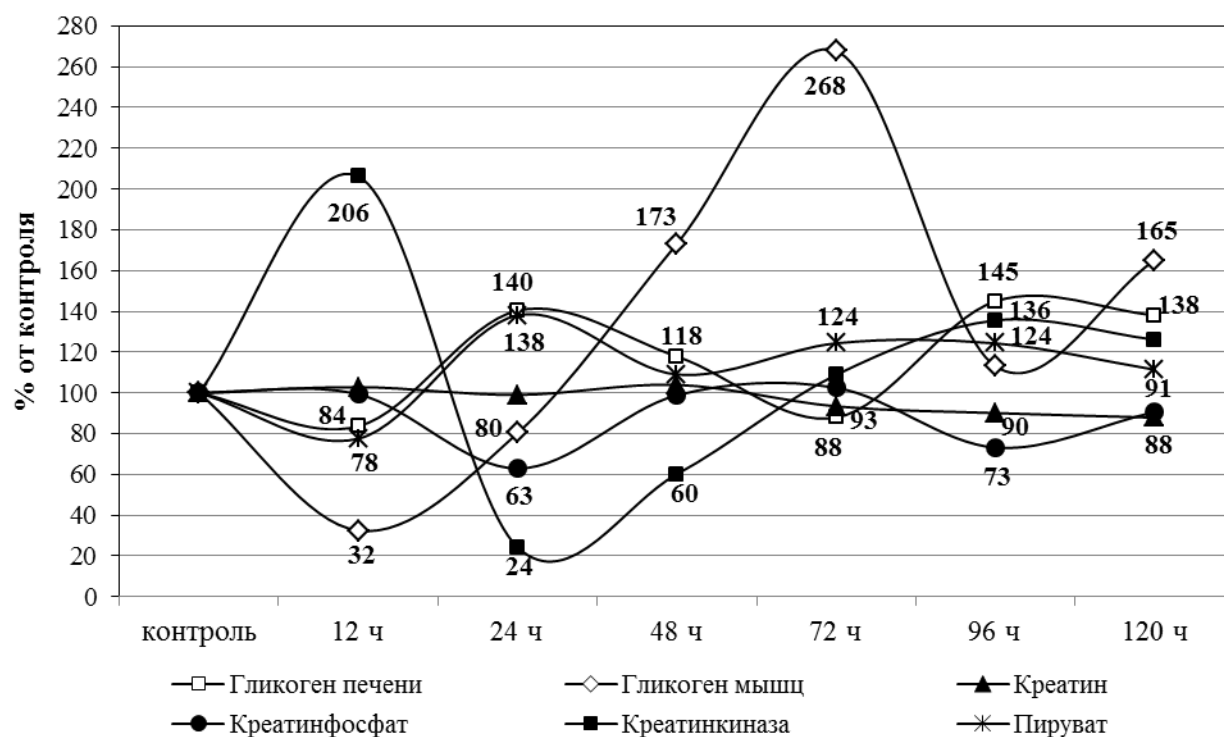
Через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг наибольшие изменения наблюдались для содержания ПВК в сыворотке крови лабораторных мышей (рост на 86% у самок и на 24% у самцов) и гликогена мышц (увеличение на 168% у самцов и уменьшение на 79% у самок); через 96 часов – для активности ЛДГ в сыворотке крови (увеличение на 33% у самок и на 36% у самцов) и гликогена печени (увеличение на 37% у самок и на 45% у самцов).

Содержание гликогена печени оставалось повышенным относительно контрольной группы и через 120 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг (на 27% у самок и 38% у самцов). Определение содержания креатина и КрФ в скелетных мышцах, уровня ПВК и активности КК и ЛДГ в крови через 120 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг показало небольшие (в пределах 17%)

изменения для самцов и отсутствие достоверных отличий для самок лабораторных мышей.



Самки



Самцы

Рис. 1. Содержание биохимических показателей углеводного обмена самок и самцов опытной группы лабораторных мышей (в % относительно контрольных групп) после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание. По оси абсцисс – срок эксперимента. Значения отличий (в %) указаны в случае статистически значимых различий при $p \leq 0,05$.

Нами было отмечено, что динамика изменения содержания гликогена в печени опытных групп самцов и самок в ответ на введение МФК в дозе 2 мг/кг была одинаковой: уровень гликогена изменялся по типу синусоиды с точкой минимума через 72 часа после введения и точками максимума через 24 и 96 часов. У самок наблюдалась схожая динамика изменения содержания гликогена в печени и мышцах, у самцов такой зависимости обнаружено не было. Также нами было обнаружено, что у самцов преобладали процессы образования гликогена в тканях, а у самок – процессы распада. В целом, введение МФК в дозе 2 мг/кг оказывало большее влияние на содержание гликогена в тканях самцов лабораторных мышей (по сравнению с самками), что возможно связано с различной гормональной регуляцией адаптации организма мышей в ответ на введение МФК. Кроме того, была выявлена схожая у самцов и самок динамика изменения активности КК в сыворотке крови опытных групп: наблюдалось повышение активности относительно контроля с 24 до 96 часов (соответственно с 40% до 133% у самок и с 24% до 136% у самцов) и нормализация через 120 часов (см. рис. 1).

Проведенный факторный анализ полученных результатов показал наличие двух основных факторов влияния МФК на показатели углеводного обмена самцов и самок лабораторных мышей, описывающих около 84% дисперсии. Для обнаруженных факторов нами были предложены названия «кислородная обеспеченность ткани» и «субстратное регулирование».

По результатам исследования биохимических показателей нами было установлено, что наиболее значительные изменения биохимических показателей углеводного обмена лабораторных мышей в ответ на подкожное введение МФК в дозе 2 мг/кг наблюдаются через 72 часа эксперимента.

Нами было обнаружено, что у самок лабораторных мышей через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг массы тела наблюдалась активация процессов углеводно-энергетического обмена. Так, был выявлен сдвиг равновесия в системе креатин↔креатинфосфат в сторону образования КрФ. Кроме того, наблюдалась активация гликогенолиза и гликолиза, что приводило к значительному уменьшению содержания гликогена в тканях и повышению содержания ПВК в сыворотке крови (см. рис. 2). В свою очередь, у самцов лабораторных мышей через 72 часа эксперимента было обнаружено понижение содержания гликогена в печени с одновременным увеличением содержания ПВК в сыворотке крови. При этом в скелетных мышцах преобладало запасание субстратов энергетического обмена: наблюдалось значительное накопление (в

2,7 раза по сравнению с контролем) гликогена в скелетных мышцах и тенденция к образованию КрФ из креатина (см. рис. 2).

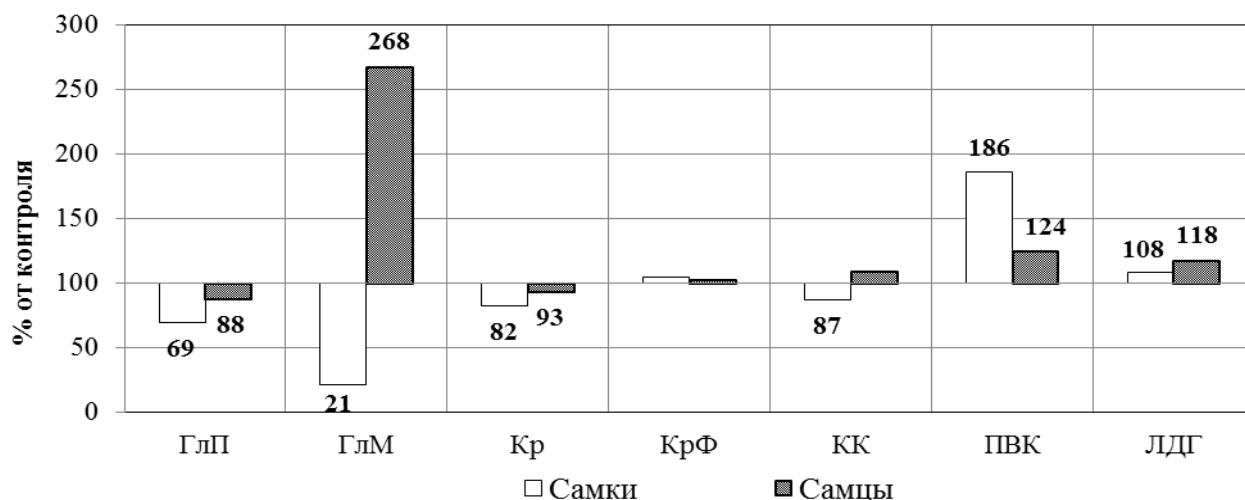


Рис. 2. Содержание биохимических показателей углеводного обмена самок и самцов опытной группы лабораторных мышей (в % относительно контрольной группы) через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание. ГлП – гликоген печени, ГлМ – гликоген мышц, Кр – креатин, КрФ – креатинфосфат, КК – креатинкиназа, ПВК – пируват, ЛДГ – лактатдегидрогеназа. Значения отличий (в %) указаны в случае статистически значимых различий при $p \leq 0,05$.

При изучении биохимических показателей углеводного обмена через 72 часа после подкожного введения различных доз МФК были получены следующие данные.

При введении всех изученных доз МФК в диапазоне от 2 до 10^{-18} мг/кг у самок опытной группы наблюдалось понижение содержания гликогена печени (максимально на 60% относительно контроля при введении МФК в дозе 10^{-9} мг/кг). У самцов опытной группы в диапазоне доз от 2 до 10^{-9} мг/кг также наблюдалось понижение содержания гликогена печени (максимально на 23% относительно контроля при введении МФК в дозе 10^{-9} мг/кг), а при введении МФК в дозах 10^{-12} и 10^{-15} мг/кг наблюдалось повышение содержания гликогена печени (на 37% и 55% относительно контроля соответственно). Подобная ситуация наблюдалась и в изменении содержания гликогена мышц. Так, у самок наблюдалось достоверное снижение уровня гликогена мышц относительно контроля при введении всех изучаемых доз МФК (максимально на 79% при введении МФК в дозе 2 мг/кг); у самцов содержание гликогена мышц было понижено (на 33%) только при введении МФК в дозе 10^{-3} мг/кг, а при введении в дозах 2, 10^{-9} и 10^{-12} мг/кг – значительно превышало значения контроля (в 2,1-2,7 раза) (см. рис. 3). Полученные данные позволяют сделать вывод о возможной активации процессов гликогенолиза у самок.

Также нами было обнаружено, что введение лабораторным мышам различных доз МФК оказывает большее влияние на содержание креатина, чем КрФ. Кроме того, было отмечено, что в основном данные показатели изменялись у самцов, а наибольшее влияние на данные метаболиты оказывало введение МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-12} мг/кг массы тела (см. рис. 3).

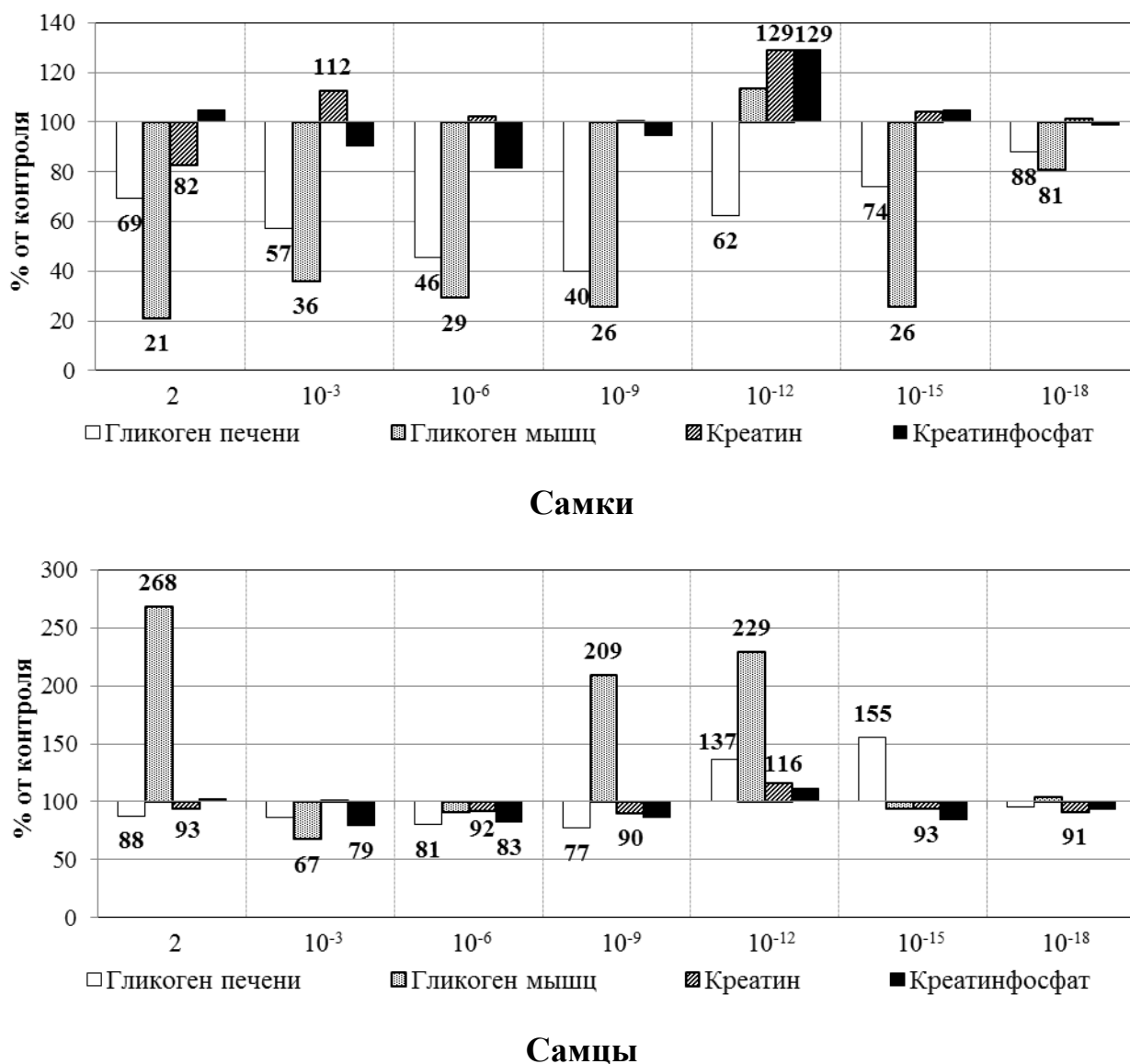
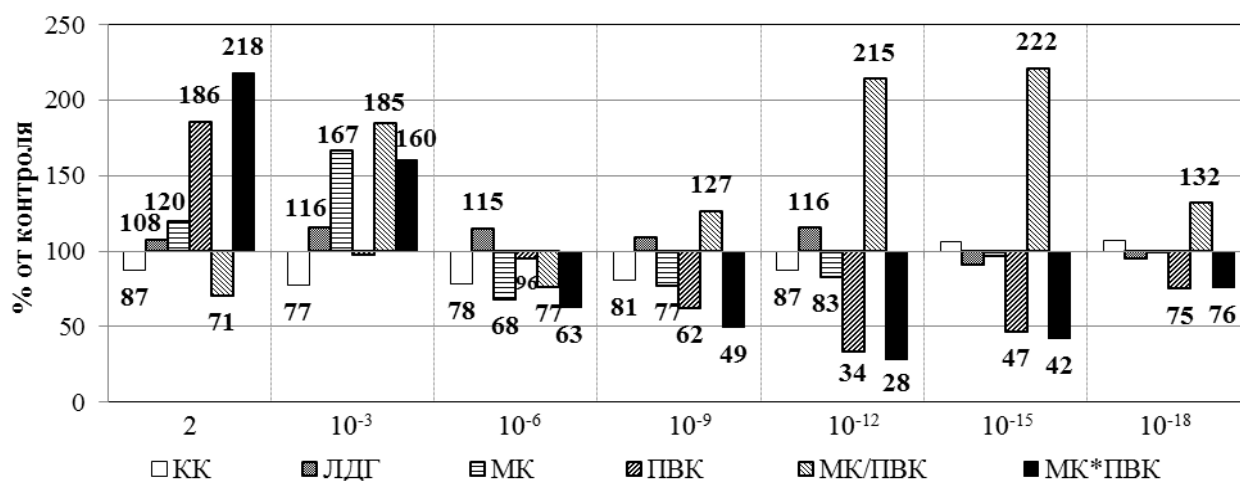


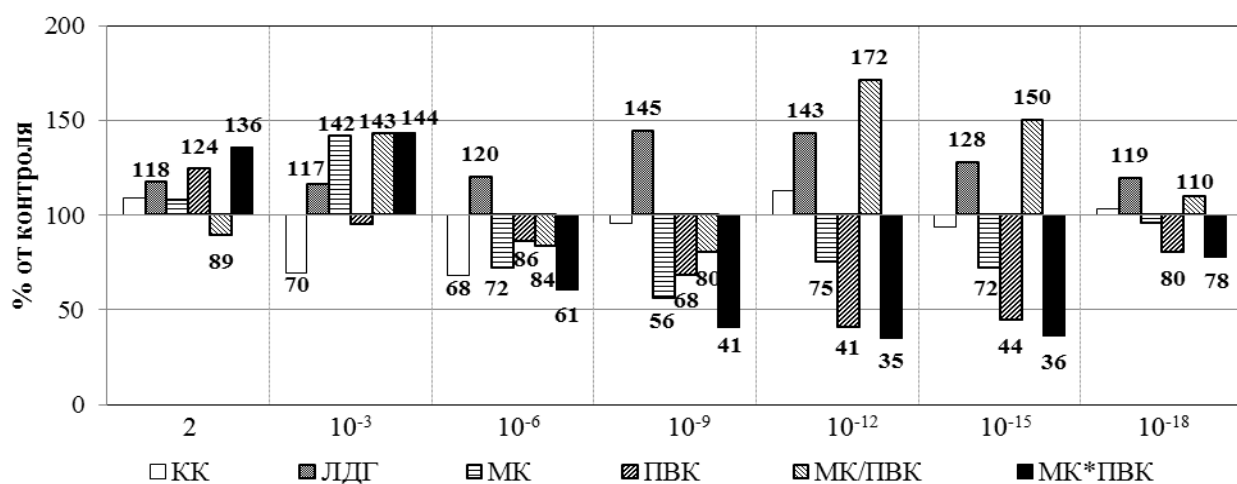
Рис. 3. Содержание некоторых энергетических субстратов в печени и мышцах самок и самцов опытных групп лабораторных мышей (в % относительно контрольных групп) через 72 часа после подкожного введения различных доз МФК. Примечание. По оси абсцисс – вводимая доза МФК, мг/кг. Значения отличий (в %) указаны в случае статистически значимых различий при $p \leq 0,05$.

При изучении активности КК и ЛДГ в сыворотке крови была обнаружена следующая зависимость от пола особей: у самок введение различных доз МФК оказывало большее влияние на активность КК, а у самцов – на активность ЛДГ (см. рис. 4). При этом активность КК у лабораторных мышей опытных групп была понижена по сравнению с контролем: у самок – в диапазоне вводимых доз

от 2 до 10^{-12} мг/кг (на 23-33%), а у самцов при введении в дозах 10^{-3} и 10^{-6} мг/кг МФК (на 30% и 32%, соответственно). В то же время активность ЛДГ при введении МФК в различных дозах повышалась по сравнению с контролем, что можно объяснить активацией гликолитических процессов.



Самки



Самцы

Рис. 4. Содержание продуктов гликолиза и активность ферментов в сыворотке крови самок и самцов опытных групп лабораторных мышей (в % относительно контрольных групп) через 72 часа после подкожного введения различных доз МФК. Примечание. По оси абсцисс – вводимая доза МФК, мг/кг. КК – креатинкиназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ПВК – пируват, МК – лактат. Значения отличий (в %) указаны в случае статистически значимых различий при $p \leq 0,05$.

Анализ изменений концентраций лактата и пирувата в сыворотке крови лабораторных мышей у опытных групп относительно контроля при понижении вводимой дозы МФК выявил сходную динамику изменений для данных показателей (см. рис. 4). Так, при введении МФК в дозах 2 и 10^{-3} мг/кг содержание МК в сыворотке крови было повышено (максимально на 67% у

самок и на 42% у самцов при введении МФК в дозе 10^{-3} мг/кг), а при введении меньших доз – понижено относительно контроля. Введение МФК в дозе 10^{-18} мг/кг достоверных отличий в содержании МК не вызывало. Одновременно, уровень ПВК в сыворотке крови опытных групп также был повышен относительно контроля при введении МФК в дозе 2 мг/кг (на 86% у самок и на 24% у самцов). При уменьшении дозы до 10^{-3} мг/кг значения уже достоверно не отличались от контрольных. При введении остальных доз наблюдалось достоверное понижение содержания ПВК в сыворотке крови опытных групп относительно контроля, максимально при введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг: до 34% у самок и 41% у самцов. Проведенный анализ изменения отношения лактата и пирувата (МК/ПВК), а также их произведения (МК*ПВК) с целью определения интенсивности и направленности процесса гликолиза выявил, что при введении МФК в дозах 2 и 10^{-3} мг/кг массы тела наблюдалось накопление продуктов гликолиза, при понижении вводимой дозы – их расход. Изменение соотношения МК/ПВК соответствует о перераспределении анаэробных и аэробных процессов в сторону преобладания анаэробных, особенно в области низких доз.

В результате проведенных исследований влияния различных доз МФК на биохимические показатели углеводного обмена лабораторных мышей было выявлено наибольшее влияние введения МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-12} мг/кг (рис. 5).

При введении МФК в дозе 10^{-3} мг/кг, возможно, вследствие активации гликогенолиза, наблюдалось снижение содержания гликогена в тканях: в печени на 43 и 14 %, в мышцах на 64 и 33 % у самок и самцов соответственно. У самок лабораторных мышей уровень КрФ имел тенденцию к понижению, а содержание креатина повышалось, вследствие чего происходило повышение суммарного содержания данных метаболитов в тканях, а соотношение КрФ/Креатин понижалось. У самцов же значения креатина не отличались от контрольных, а содержание КрФ в скелетных мышцах понижалось, следствием чего стало снижение как суммарного показателя, так и соотношения данных метаболитов. Это говорило о возможном распаде части КрФ до креатинина. В целом данные указывают на активизацию катаболических процессов у лабораторных мышей в ответ на введение МФК в дозе 10^{-3} мг/кг. Учитывая, что уровень ПВК в сыворотке крови не отличался от контрольных значений, а содержание МК было повышено (на 42% у самцов и на 67% у самок), можно сделать вывод, что происходила активация анаэробного гликолиза. Накопление

лактата также повышало соотношение МК/ПВК (в 1,4 раза у самцов, в 1,9 раза у самок), что возможно свидетельствовало о некоторой степени гипоксии.

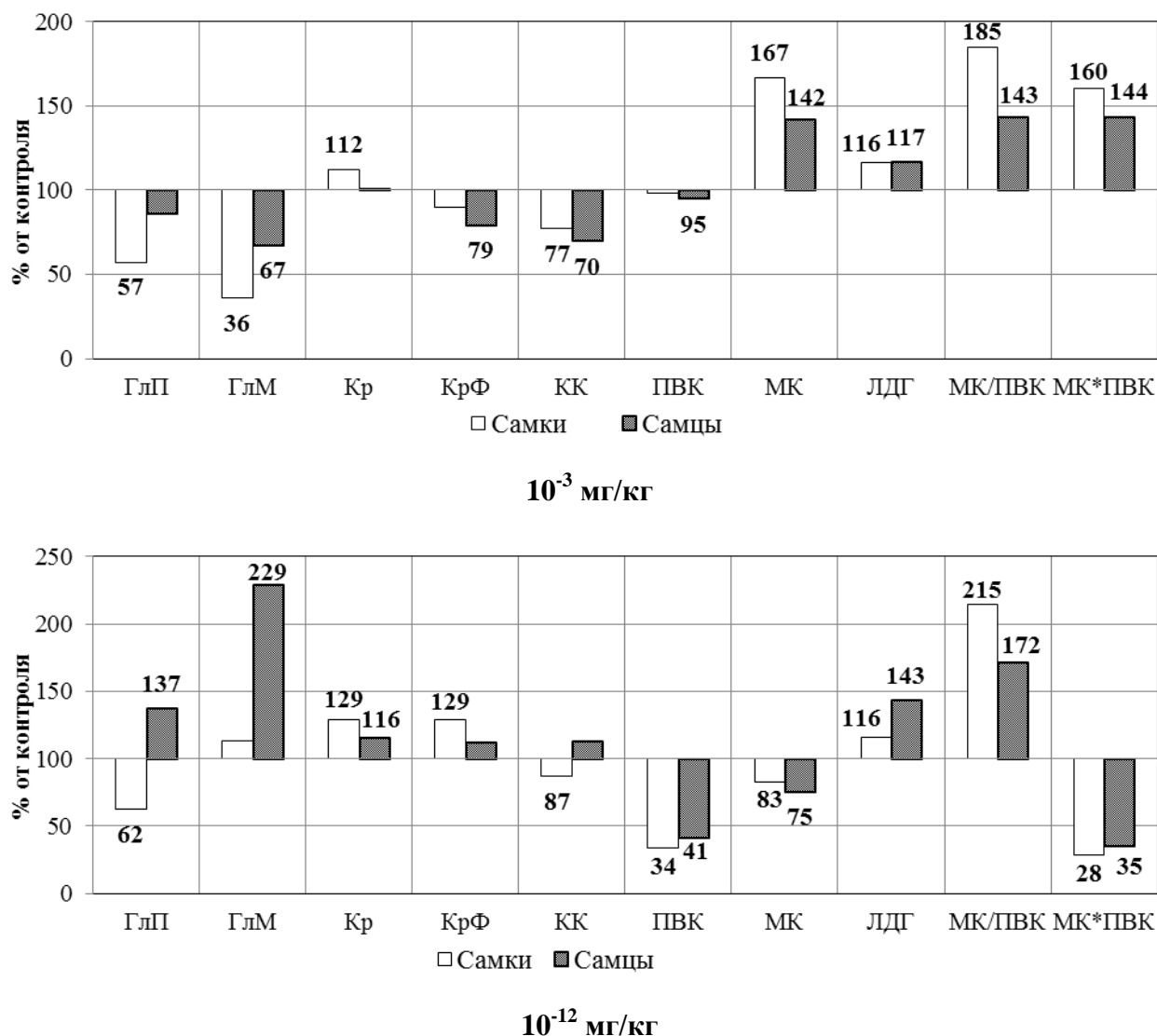


Рис. 5. Содержание биохимических показателей углеводного обмена самок и самцов опытной группы лабораторных мышей (в % относительно контрольных групп) через 72 часа после введения МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-12} мг/кг. Примечание. ГлП – гликоген печени, ГлМ – гликоген мышц, Кр – креатин, КрФ – креатинфосфат, КК – креатинкиназа, ПВК – пируват, МК – лактат, ЛДГ – лактатдегидрогеназа. Значения отличий (в %) указаны в случае статистически значимых различий при $p \leq 0,05$.

При подкожном введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг наблюдались уже более значительные половые отличия. Так, у самок содержание гликогена мышц опытной группы уже достоверно не отличалось от контрольной группы, хотя уровень гликогена в печени еще оставался пониженным (на 38%), а у самцов наблюдалось увеличение содержания гликогена в тканях. Следовательно, у самок преобладали процессы распада гликогена, а у самцов – его образования. При этом как у самок, так и у самцов наблюдалось значительное уменьшение содержания продуктов гликолиза: суммарное содержание уменьшилось в 3,6 раза у самок и в 2,9 раза у самцов, в основном за счет понижения содержания

ПВК (на 66% у самок и на 59% у самцов). Возможно, это свидетельствует о повышении скорости глюконеогенеза. В то же время соотношение МК/ПВК оставалось повышенным, особенно у самок. Содержание креатина и КрФ увеличивалось (сильнее у самок) относительно контроля, за счет чего возрастало и их суммарное содержание, а соотношение не менялось. Таким образом, проведенное исследование показало, что введение МФК в дозе 10^{-12} мг/кг наибольшее влияние оказывает на биохимические показатели углеводного обмена самок. У самцов восстановление биоэнергетики организма происходит быстрее, наблюдается активация механизмов адаптации к гипоксии. В процессе установления временного промежутка, необходимого для нормализации показателей углеводного обмена самок лабораторных мышей после однократного введения МФК в дозах 10^{-3} и 10^{-12} мг/кг, было обнаружено, что при введении высокой (10^{-3} мг/кг) дозы МФК уровень гликогена в тканях нормализуется к 18-м суткам эксперимента, а при введении низкой дозы (10^{-12} мг/кг) – уже к 12-м суткам. При этом пониженное (на 38-43%) содержание гликогена в печени через трое суток после введения МФК восстанавливалось к 6-м суткам эксперимента до уровня контрольных значений, хотя через 12 суток после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг снова наблюдалось небольшое, но достоверное понижение содержания гликогена в печени. Уровень гликогена в мышцах после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг оставался ниже контрольных значений в течение первых 6-и суток эксперимента, а в дозе 10^{-12} мг/кг – наоборот, наблюдалась тенденция к повышенному содержанию гликогена в мышцах (рис. 6).

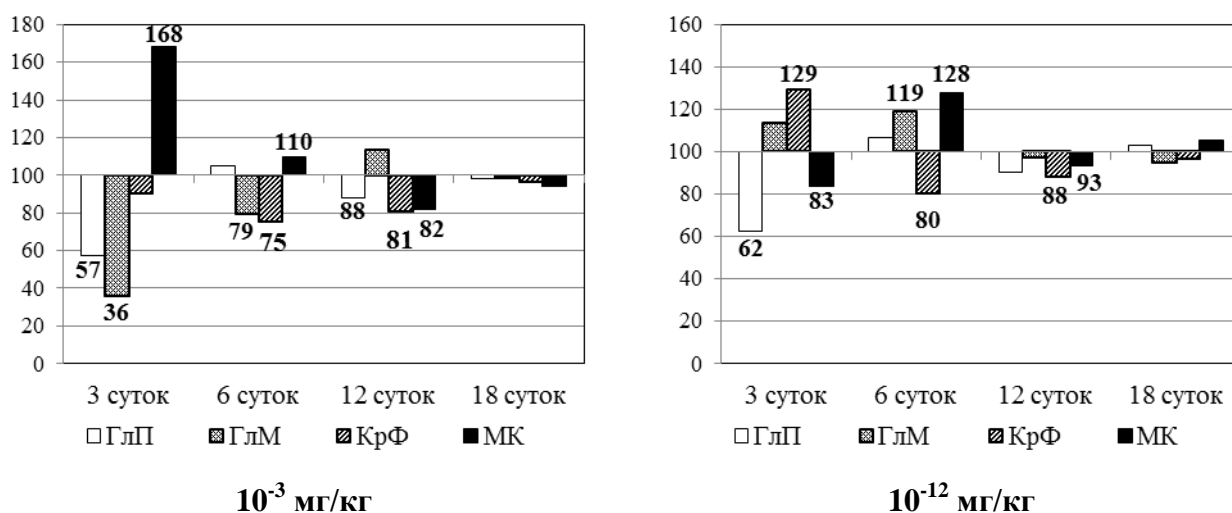


Рис. 6. Изменение содержания наиболее информативных показателей самок опытных групп лабораторных мышей (в % относительно контрольных групп) через 3, 6, 12 и 18 суток после подкожного введения МФК в дозах 10^{-3} , 10^{-12} мг/кг. Примечание. Значения отличий (в %) указаны в случае статистически значимых различий при $p \leq 0,05$.

Содержание креатина и КрФ в скелетных мышцах самок в проведенном эксперименте полностью восстанавливалось к 18-м суткам эксперимента. Было отмечено, что после введения МФК в дозе 10^{-3} мг/кг уровень креатина был повышен только через трое суток, а уровень КрФ наоборот, оставался ниже контрольных значений вплоть до 12-х суток эксперимента. При введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг через трое суток мы наблюдали повышение содержания как креатина, так и КрФ. Через 6 и 12 суток эксперимента уровень КрФ был понижен, в то время как содержание креатина уже достоверно не отличалось от контрольных значений.

Содержание лактата в сыворотке крови самок опытной группы полностью восстанавливалось к 18-м суткам. При этом были выявлены следующие особенности: при введении МФК в дозе 10^{-3} мг/кг через 3 и 6 суток наблюдалось повышенное содержание МК, через 12 суток – пониженное. При подкожном введении МФК в дозе 10^{-12} мг/кг через 3 и 12 суток было отмечено уменьшение содержания МК, а через 6 суток его рост относительно контрольной группы.

Проведенный нами анализ биохимических показателей углеводного обмена самок в остром эксперименте после однократного введения МФК в высокой (10^{-3} мг/кг) и низкой (10^{-12} мг/кг) дозах обнаружил, что изменения проявлялись вплоть до 12 суток эксперимента. Тем не менее, к 18-м суткам происходила полная нормализация всех показателей.

Таким образом, проведенные исследования показали, что МФК в различных дозах и при различной длительности эксперимента оказывает достоверное влияние на биохимические показатели углеводного обмена лабораторных мышей. При этом отмеченные изменения являются обратимыми.

ВЫВОДЫ

1. МФК оказывает влияние на биохимические показатели углеводного обмена лабораторных мышей. Наиболее значительные изменения, особенно у самок, были выявлены через 72 часа после подкожного введения МФК в дозе 2 мг/кг: обнаружено увеличение содержания пирувата в сыворотке крови в 1,9 раза и снижение содержания гликогена мышц в 4,8 раза, т.е. наблюдалась активация процессов углеводно-энергетического обмена с целью адаптации организма к гипоксии.

2. МФК обладает дозозависимым эффектом. Установлено, что у самцов и самок лабораторных мышей введение высокой (10^{-3} мг/кг) дозы МФК вызывает гипоксию: уровень гликогена в тканях понижается в 1,5-2,8 раза, содержание

лактата в сыворотке крови повышается в 1,4-1,7 раза; а в ответ на введение низкой (10^{-12} мг/кг) дозы МФК наблюдается активация механизмов адаптации к гипоксии: уменьшение в 2,8-3,5 раза суммарного содержания продуктов гликолиза в сыворотке крови, повышение у самцов уровня гликогена в печени в 1,4 раза, в мышцах в 2,3 раза, тенденция к повышению уровня гликогена в мышцах у самок.

3. Возврат к нормальным значениям биохимических показателей углеводного обмена самок после однократного введения МФК в высокой (10^{-3} мг/кг) и низкой (10^{-12} мг/кг) дозах происходит к 18-м суткам эксперимента.

4. Введение МФК у самцов оказывает большее влияние на содержание гликогена в тканях, а у самок – на содержание продуктов гликолиза в крови. Определение данных показателей может быть рекомендовано в качестве критериев оценки воздействия МФК на углеводный обмен теплокровных организмов.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Плотникова, О.М. Особенности влияния различных доз метилфосфоновой кислоты на основные биохимические показатели метаболизма лабораторных мышей / О.М. Плотникова, **И.В. Савинова**, Н.Н. Матвеев, А.М. Корепин, А.Н. Евдокимов, С.Н. Лунева // Вестник Челябинского государственного педагогического университета. - 2011. – №1. – С. 307-316.

2. Плотникова, О.М. Оценка влияния низких доз метилфосфоната на теплокровных животных по биохимическим показателям крови мышей / О.М. Плотникова, Н.Н. Матвеев, **И.В. Савинова**, А.М. Корепин, С.Н. Лунева // Естественные и технические науки. - 2011. – №3. – С. 32-37.

3. Савинова, И.В. Изучение некоторых показателей углеводного обмена лабораторных мышей при интоксикации метилфосфонатом / И.В. Савинова, О.М. Плотникова, С.Н. Лунева // Естественные и технические науки. – 2011. – №3. – С. 38-41.

4. Плотникова, О.М. Оценка токсикологического воздействия метилфосфоната на показатели метаболизма лабораторных мышей / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, **И.В. Савинова**, Н.Н. Матвеев, С.Н. Лунева // Проблемы региональной экологии. – 2011. № 3. – С.138-142.

5. Плотникова, О.М. Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом / О.М. Плотникова, Н.Н. Матвеев, А.М. Корепин, **И.В. Дуплякина** // Теоретическая и прикладная экология. – 2010. – № 1. – С. 81-86.

6. Плотникова, О.М. Свободнорадикальное окисления белков и липидов и энергетический обмен у лабораторных мышей при воздействии метилфосфонатов как специфических поллютантов / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, **И.В. Дуплякина**, С.Н. Лунева // Бюллетень Московского общества испытателей природы. – 2009. – Т. 114, вып. 3 (Ч. 3). – С. 162-165.

7. Плотникова, О.М. Оценка экотоксичности специфических загрязняющих веществ по изменению биохимических показателей живых организмов / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, **И.В. Дуплякина**, Н.Н. Матвеев // Теоретическая и прикладная экология. – 2008. – №4. – С. 42-47.

8. Плотникова, О.М. Изучение показателей энергетического обмена лабораторных мышей при интоксикации метилфосфоновой кислотой / О.М. Плотникова, **И.В. Дуплякина** // Региональные проблемы природопользования и охраны окружающей среды : Мат. регион. науч.-практ. конф. – Курган, 2008. – С. 213-216.

9. Плотникова, О.М. Изучение показателей системы лактат-пируват-активность лактатдегидрогеназы у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфонатом / О.М. Плотникова, **И.В. Дуплякина** // Экологические проблемы промышленных городов. Сб. научных трудов. – Саратов, 2009. – Ч.2. – С. 198-199.

10. Plotnikova, O.M. Small rodents as bioindicators for the buffer zone at the objects of storage and destruction of chemical weapons (Мелкие грызуны как биоиндикаторы в зонах защитных мероприятий объектов уничтожения химического оружия) / O.M. Plotnikova, **I.V. Dupliakina**, A.M. Korepin, N.N. Matveev, B.I. Kudrin, A.N. Evdokimov // BIOINDICATORS 17 (17th International Conference on Environmental Bioindicators: Book of Abstract). – Moscow : MSU, 2009. – P. 81.

11. Дуплякина, И.В. Содержание гликогена в печени и мышцах при интоксикации организма мышей линии СВА метилфосфоновой кислотой / И.В. Дуплякина, О.М. Плотникова, С.Н. Лунева // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития : Мат. Всерос. науч.-практ. конф. – Киров, 2009. – Вып.7. Ч. 2. – С. 55-57.

12. Дуплякина, И.В. Изучение показателей углеводного обмена лабораторных мышей при действии метилфосфонатом в средних и сверхмалых дозах / И.В. Дуплякина // Молодежный научный потенциал в инновационном развитии Уральского региона: Мат. регион. конф. молодых ученых,

посвященной году молодежи в России. – Курган : изд-во Курганской ГСХА, 2009. – С. 59-61.

13. Дуплякина, И.В. Влияние интоксикации метилфосфонатом на энергетический обмен в организме мелких теплокровных животных / И.В. Дуплякина, А.А. Абзаева, О.М. Плотникова // Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы : мат. рег. мол. науч.-практ. конф. с межд. уч. – Улан-Удэ : Изд-во Бурятского ун-та, 2010. – С. 87-88.

14. Плотникова, О.М. К вопросу возможного влияния на мелких грызунов метилфосфонатов – особой группы веществ антропогенной природы / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, И.В. Дуплякина // Антропогенная трансформация природной среды : мат. межд. конф. – Пермь : Изд-во Пермского государственного университета, 2010. – С. 133-140.

15. Дуплякина, И.В. Изучение содержания гликогена при интоксикации организма мышей линии СВА метилфосфоновой кислотой / И.В. Дуплякина // Мат. XXI Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Москва-Калуга : Типография ООО «БЭСТ-принт», 2010. – С. 196.

16. Савинова, И.В. Изменение некоторых показателей углеводного обмена лабораторных мышей в ответ на введение метилфосфоната / И.В. Савинова, О.М. Плотникова // Биология будущего: традиции и инновации : мат. всерос. мол. науч. конф. с межд. уч. – Екатеринбург : Изд-во УРГУ, 2010. – С. 141-142.

17. Плотникова, О.М. Влияние метилфосфоната в высоких и малых дозах на основные биохимические показатели метаболизма лабораторных мышей. / О.М. Плотникова, С.Н. Лунева, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, **И.В. Савинова**, А.Н. Евдокимов // Вестник Курганского университета. Серия «Естественные науки». – 2010. – Вып. 3. - С. 81-85.

18. Савинова, И.В. Влияние подкожного введения метилфосфоновой кислоты на некоторые показатели углеводного обмена лабораторных мышей линии СВА / И.В. Савинова, О.М. Плотникова, С.Н. Лунева // Современные проблемы биомониторинга и биоиндикации : Мат. VIII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Киров : ООО «Лобань», 2010. – Ч. 1. – С. 196-198.

19. Лунева, С.Н. Изучение содержания гликогена лабораторных мышей при введении метилфосфоновой кислоты / С.Н. Лунева, О.М. Плотникова, **И.В. Савинова**, Н.Н. Матвеев, А.М. Корепин // мат. науч.практ. конф. посвященной 200-летию со дня рождения Николая Ивановича Пирогова. – Курган, 2010. – С. 253-254.

20. Лунева, С.Н. Перекисное окисление белков и содержание маркеров эндогенной интоксикации при введении метилфосфоновой кислоты лабораторным мышам / С.Н. Лунева, О.М. Плотникова, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, **И.В. Савинова** // мат. науч.практ. конф. посвященной 200-летию со дня рождения Николая Ивановича Пирогова. – Курган, 2010. – С. 254-256.

21. Лунева, С.Н. Влияние интоксикации метилфосфонатом на основные биохимические показатели метаболизма у лабораторных мышей / С.Н. Лунева, О.М. Плотникова, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, **И.В. Савинова** // мат. науч.практ. конф. посвященной 200-летию со дня рождения Николая Ивановича Пирогова. – Курган, 2010. – С. 256-257.

22. Плотникова, О.М. Изучение показателей системы лактат-пируват-активность лактатдегидрогеназы у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфонатом / О.М. Плотникова, **И.В. Савинова** // Экологические проблемы промышленных городов. Сб. научных трудов. – Саратов, 2011. – Ч.1. – С. 289-290.

23. Матвеев, Н.Н. Биохимические показатели у мышей через сутки после интоксикации метилфосфоновой кислотой / Н.Н. Матвеев, **И.В. Савинова**, А.М. Корепин, О.М. Плотникова // Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы : мат. рег. мол. науч.-практ. конф. с межд. уч. – Улан-Удэ : Изд-во Бурятского ун-та, 2011. – С. 188-189.

24. Плотникова, О.М. Биологическая активность алкилфосфонатов: влияние метилфосфоновой кислоты на гомеостаз, методы исследования: Монография / О.М. Плотникова, С.Н. Лунева, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, **И.В. Савинова**. – Курган : Изд-во Курганского гос. ун-та, 2011. – 120 с.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат;
- КК – креатинкиназа;
- КрФ – креатинфосфат;
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа;
- МК – молочная кислота, лактат;
- МФК – метилфосфоновая кислота;
- ПВК – пировиноградная кислота, пируват;
- РЦ СГЭКиМ – Региональный центр по обеспечению государственного экологического контроля и мониторинга объектов по хранению и уничтожению химического оружия;
- ФОВ – фосфорорганические отравляющие вещества;
- ФОП – фосфорорганические пестициды;
- ФОС – фосфорорганические соединения.

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18. Казанский федеральный университет, отдел аспирантуры, Ученому секретарю Диссертационного совета Д212.081.08 Абрамовой З.И.;
факс(843) 238-76-01 E-mail: attestat.otdel@ksu.ru

Отпечатано в типографии «Дамми»
640001, г. Курган, пр. Машиностроителей, 13 А.
тел./факс: (3522) 255-530